



# *Cómo aprovechar los procesos naturales del organismo para crear terapias innovadoras*



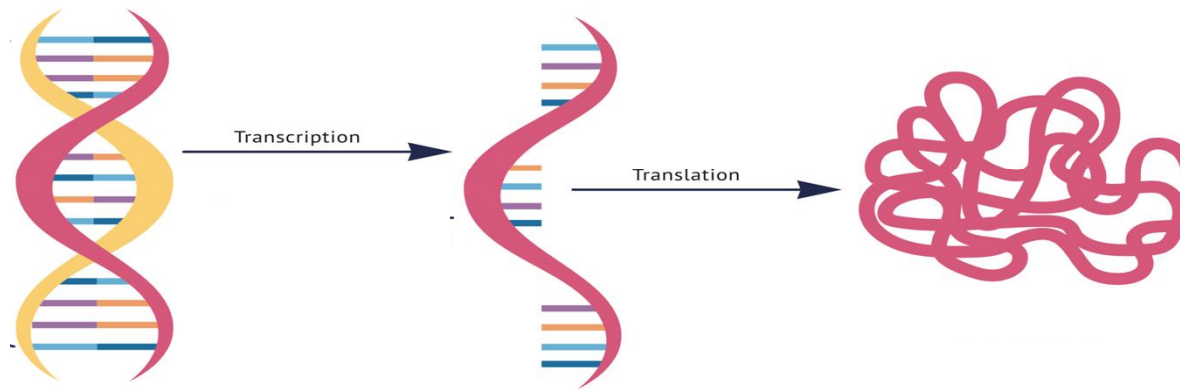
**Ramon Eritja**  
IQAC-CSIC, Barcelona  
CIBER-BBN

ciber-bbn isciiii

# Índice

- Oligonucleótidos como agentes terapéuticos
- Estrategias antisentido y RNA de interferencia
- El problema de la estabilidad en medios fisiológico. Desarrollo de modificaciones
- El problema de la administración y direccionamiento. Desarrollo de GalNAc
- Oligonucleótidos aprobados para uso humano

Todas las proteínas (dianas farmacéuticas) se generan a partir de genes a través de RNAm



Hasta ahora para tratar la sobreexpresión de una proteína tóxica se diseñan moléculas que puedan ser inhibidores de la acción bioquímica de la proteína.

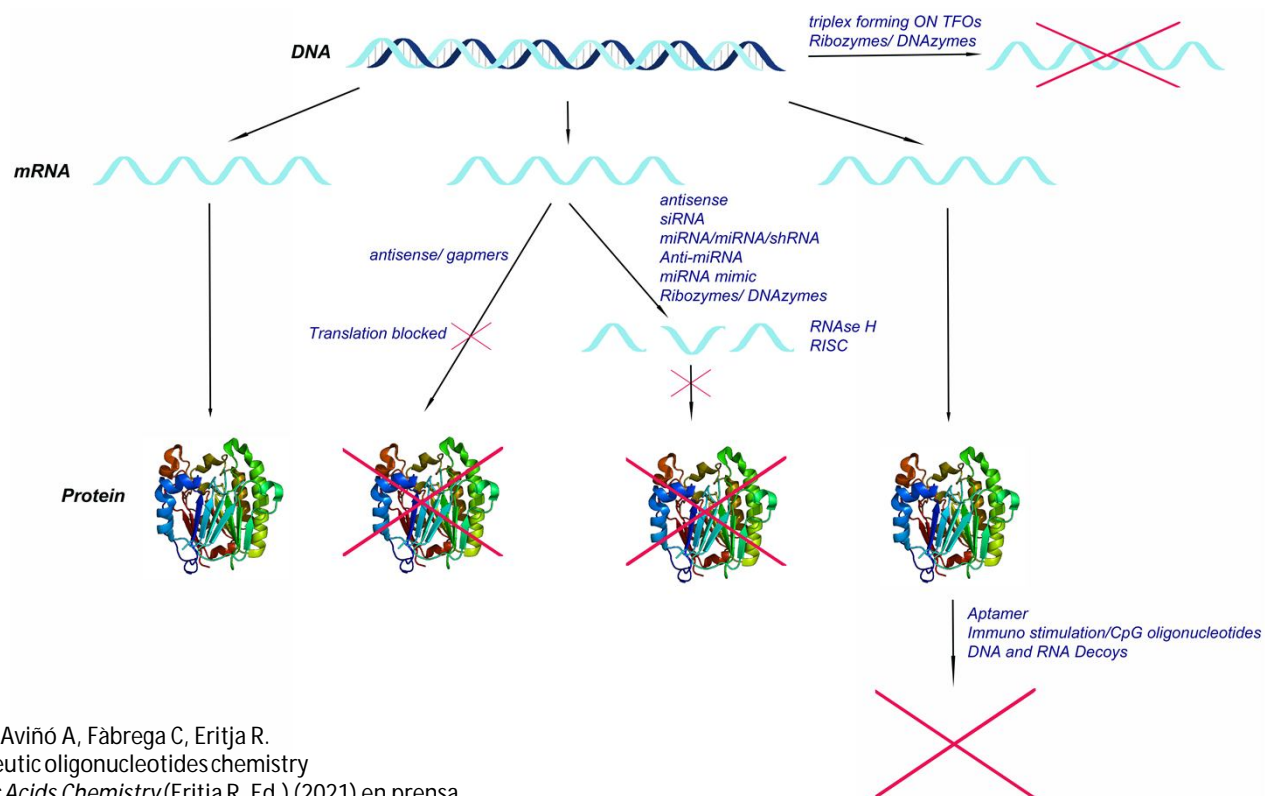
A finales de los años 80 se generó el interés por la utilización de oligonucleótidos como agentes terapéuticos. En este caso se pretende reducir la cantidad de proteína reduciendo el RNAm

Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2020  
**RNAm**, RNA mensajero; **RNA**, ácido ribonucleico

# Oligonucleótidos terapéuticos

- Inhibición o modificación de la síntesis de proteínas por interacción del RNAm con pequeños fragmentos de DNA o RNA
- No hay integración en el genoma, moléculas definidas de síntesis química. No son productos biológicos. Dos estrategias principales:
  - Tecnología antisentido
  - siRNA, ARN de interferencia

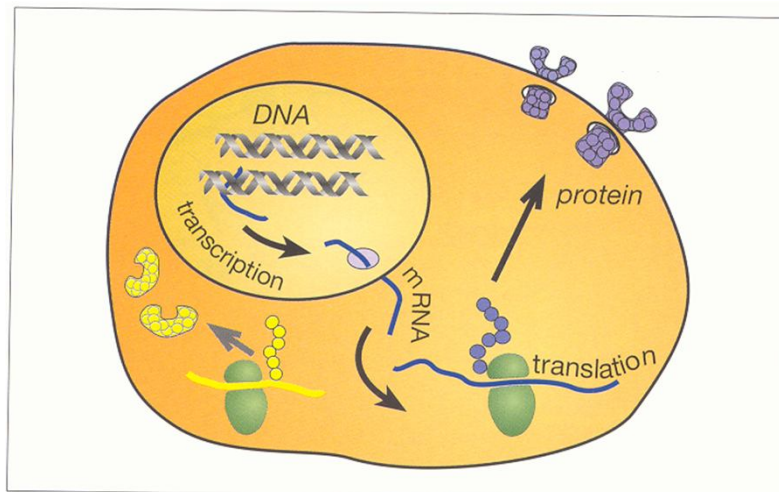
Actualmente hay un gran número de estrategias terapéuticas que usan oligonucleótidos



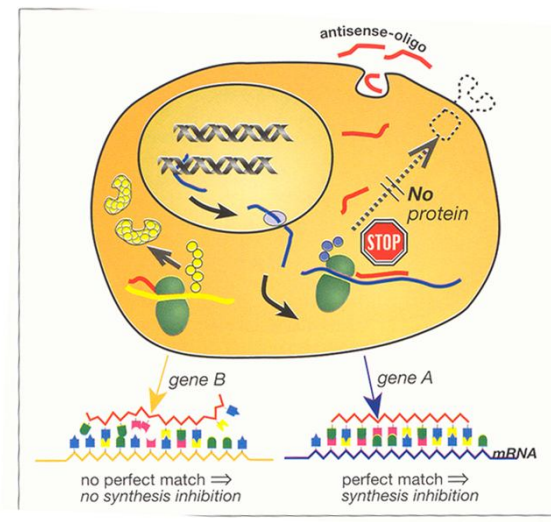
Jorge AF, Grijalvo S, Aviñó A, Fabrega C, Eritja R.  
 Advances in therapeutic oligonucleotides chemistry  
 Chapter 7 in *Nucleic Acids Chemistry* (Eritja R. Ed.) (2021) en prensa

La tecnología antisentido: Tecnología innovadora para el tratamiento de enfermedades. Se basa en el uso de oligonucleótidos de 15-25 nucleótidos que son complementarios a un mRNA específico.

Pros: La especificidad viene dada por la secuencia. Diseño universal y simple



**Expresión normal**

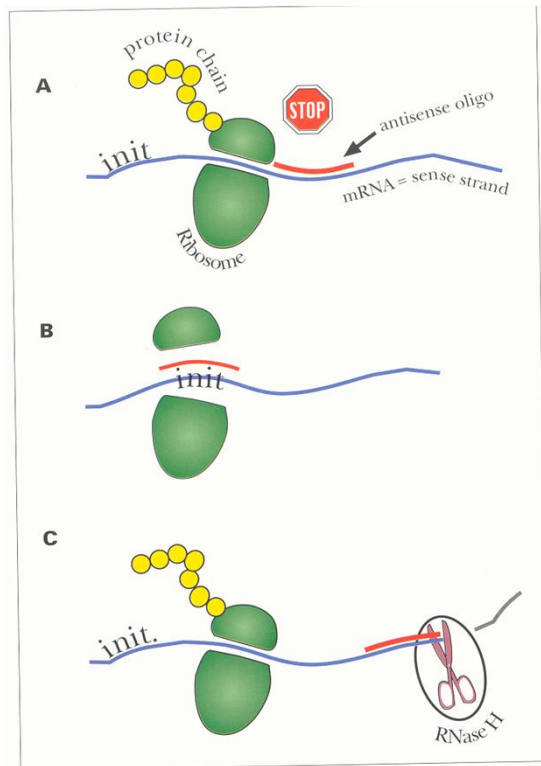


**Inhibición por oligonucleótidos**

Contras: degradación por nucleasas, entrada celular pobre

R. Schlingensiepen, W. Brysch, K.H. Schlingensiepen. *Antisense from technology to therapy Lab manual and text book*. Blackwell Science (1997).  
mRNA, RNA mensajero; RNA, ácido ribonucleico

# Mecanismos que pueden actuar durante la inhibición de la producción de proteínas



**Inhibición de la elongación**

**Inhibición del ensamblado del ribosoma**

**Degradación por Ribonucleasa H**

También contra el procesamiento (splicing) del mRNA (Exon skipping)

R. Schlingensiepen, W. Brysch, K.H. Schlingensiepen. *Antisense from technology to therapy Lab manual and text book*. Blackwell Science (1997).  
mRNA, RNA mensajero, RNA, ácido ribonucleico

## El mecanismo de RNA de interferencia es un proceso natural del organismo

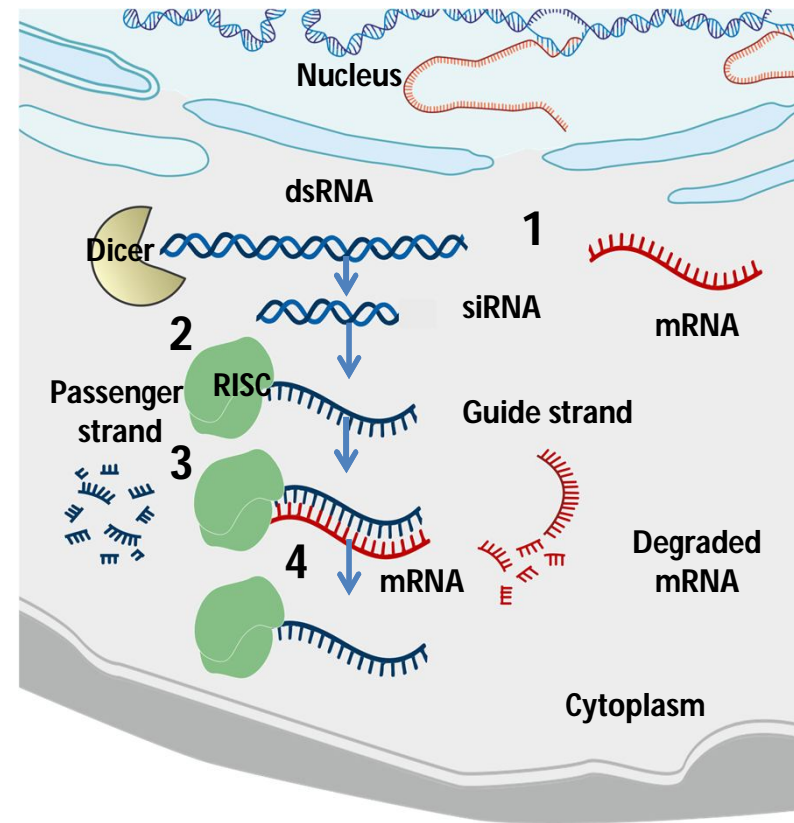
**El RNA de interferencia (RNAi) es un proceso natural de control de la expresión génica (silenciamiento génico) que estimula la degradación específica de RNAm para el control de la producción de proteínas. Descubierto en 2002.**

1- La molécula efectora del proceso es RNA de doble cadena (ds-RNA) que puede ser endógeno (como por ejemplo microRNAs) o exógeno (ARN virales, transcritos de RNA, shRNA). En ambos casos el ds-RNA es procesado por Dicer que es un enzima de actividad RNasa presente en el citoplasma que corta el ds-RNA en fragmentos de 20 bases que se denominan pequeños RNA interferentes (siRNA).<sup>1</sup>

2- Los siRNA resultantes se unen al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).<sup>1,2</sup> Uno de los componentes de RISC denominado Argonata-2, rompe una de las cadenas del siRNA denominada cadena acompañante induciendo su degradación.<sup>1,3</sup>

3- La cadena guía que ha quedado en RISC, forma un complejo muy estable con RISC que se une al RNAm diana a través de la complementariedad de sus bases.<sup>1</sup>

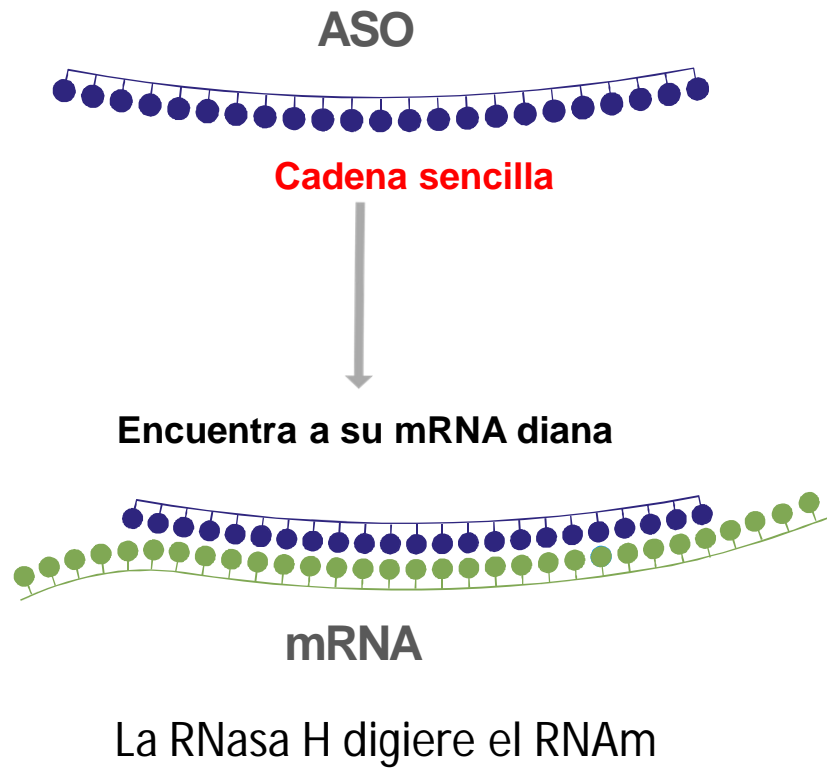
4- Argonata-2 en RISC rompe el RNAm diana disminuyendo la producción de la proteína diana.<sup>1,2</sup>



1. Lam JKW, et al. Mol Ther Nucleic Acids. 2015;4:e252; 2. Wilson RC and Doudna JA. Annu Rev Biophys. 2013;42:217-239; 3. Rand TA, et al. Cell. 2005;123:621-629  
mRNA, RNA mensajero; siRNA, RNA de interferencia pequeño.

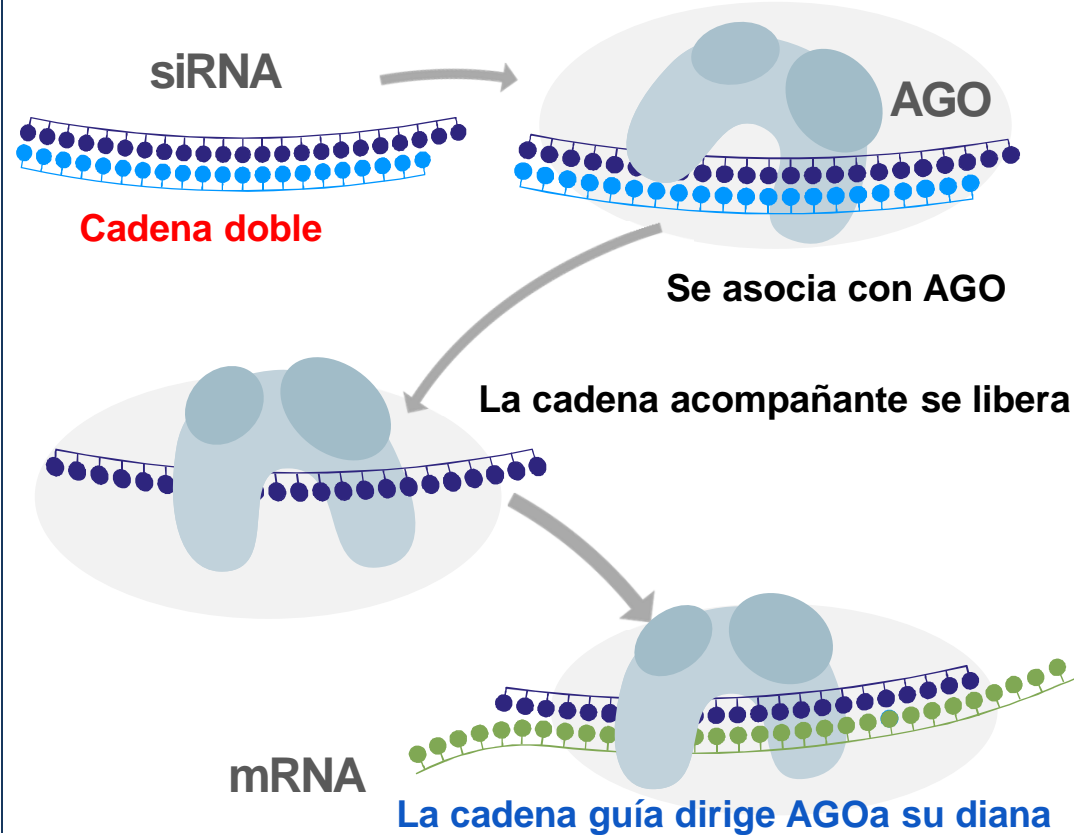


## Antisense Oligonucleotides



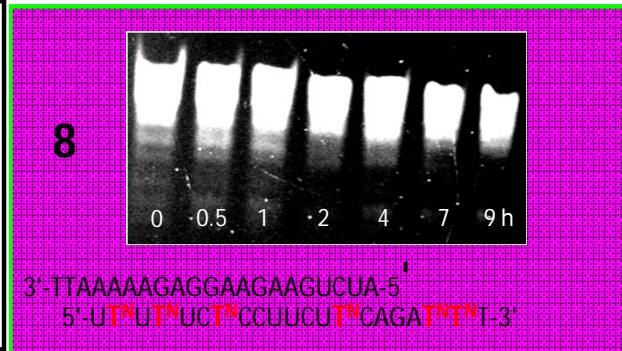
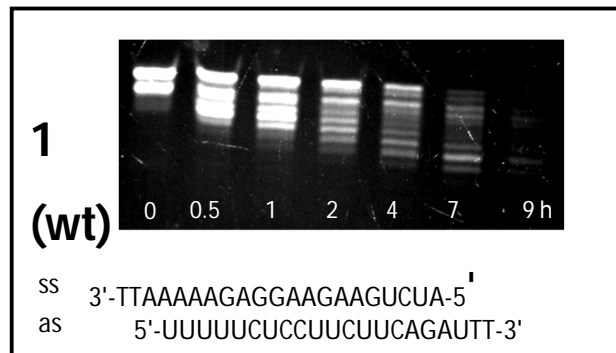
Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2020. **AGO**, proteína Argonauta; **ASO**, oligonucleótido antisentido; **mRNA**, RNA mensajero; **siRNA**, RNA de interferencia pequeño

## Small interfering RNAs

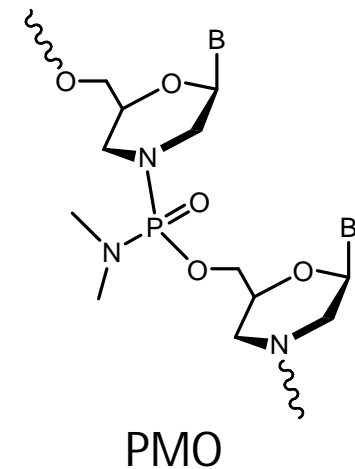
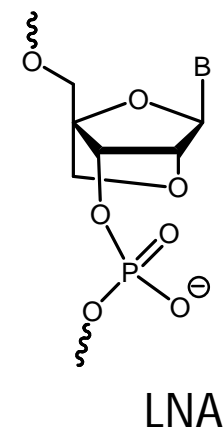
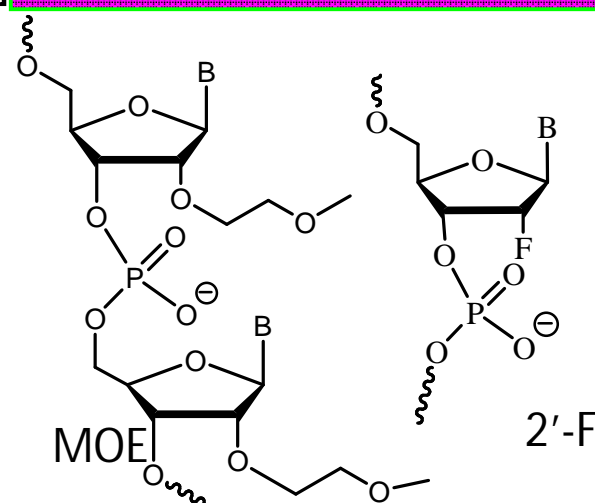
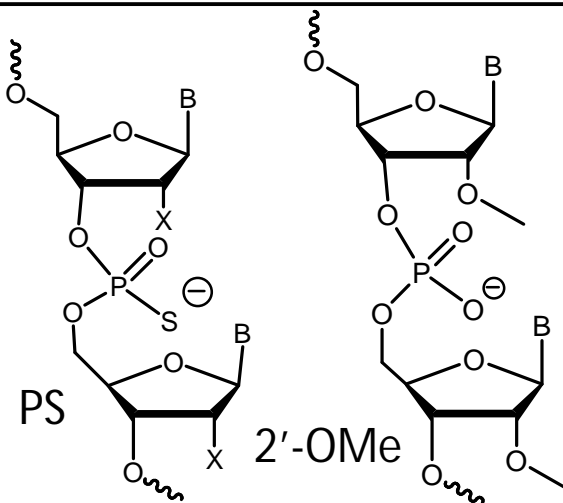


RISC corta el RNAm que se disocia y las RNasa digieren el resto del RNAm

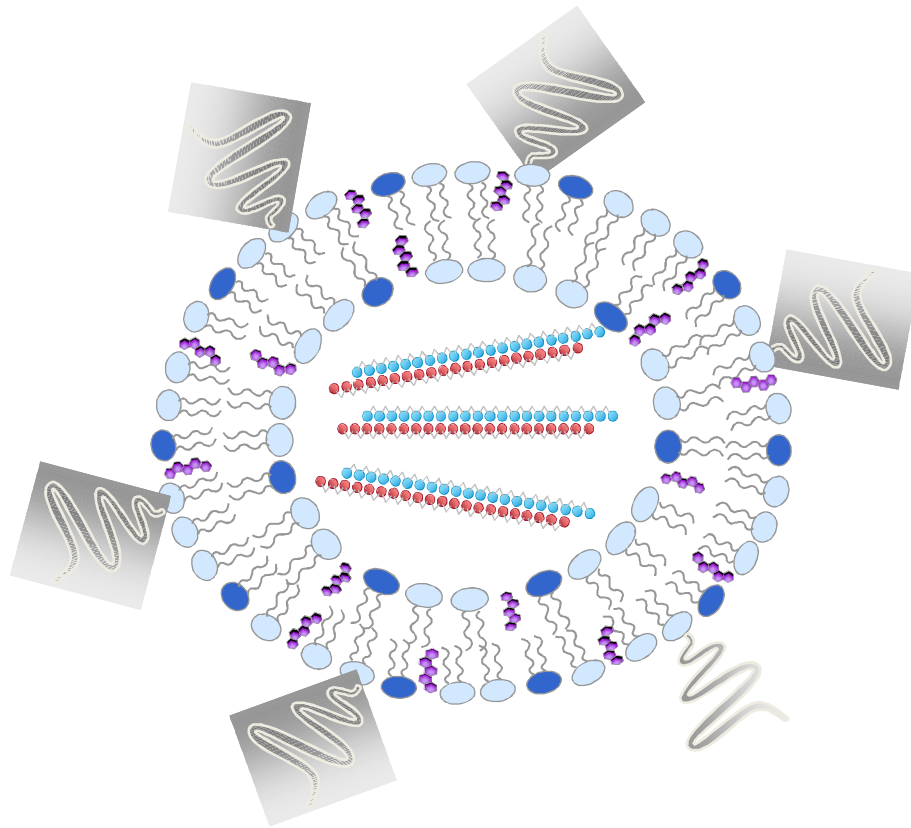
# El reto de la estabilidad en medios fisiológicos. Desarrollo de modificaciones



Terrazas, M. et al. Effect of North bicyclo[3.1.0]hexane pseudosugars on RNA interferente. A novel class of siRNA modification. ChemBioChem, 12, 1056-1065 (2011).



# El reto de la administración y direccionamiento



## Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

- Lípido catiónico
- Lípido fusiogénico
- Lípido unido a polietilenglicol
- Colesterol

## Formulación que dirige a hígado

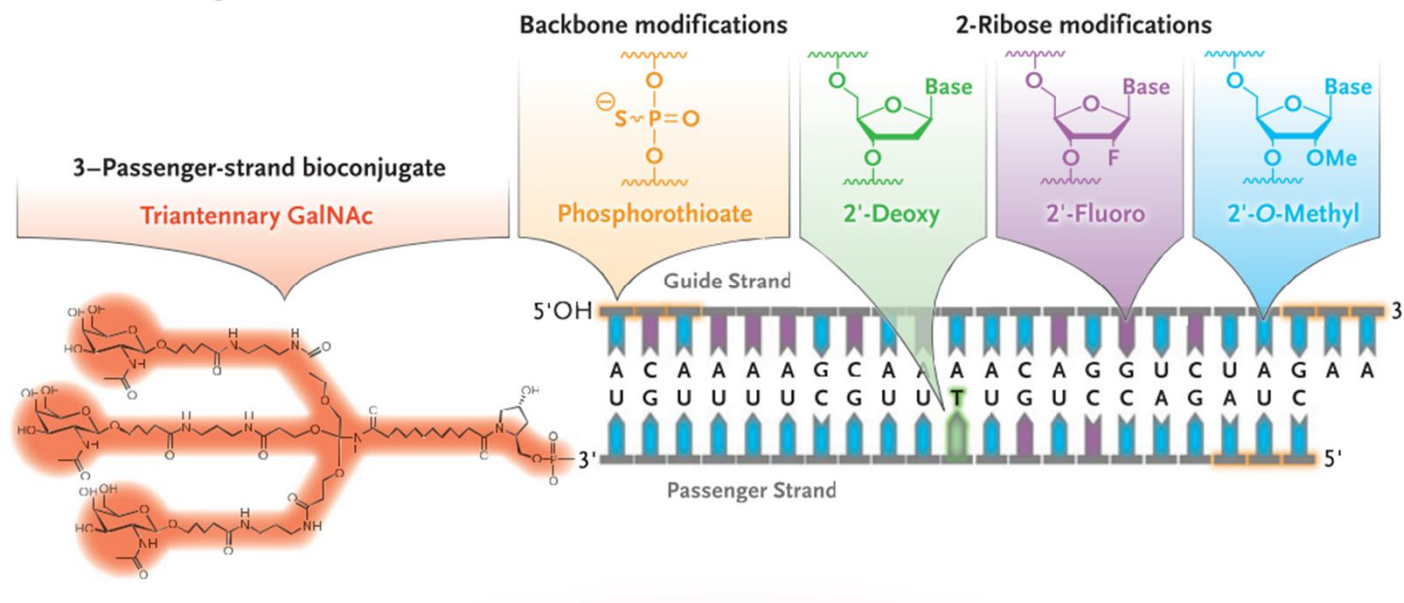
- Eficiente
- Específica de hepatocito

Utilizado en el primer siRNA aprobado  
Onpattro (Patisiran), tratamiento de hTTR  
y en vacunas de RNA

de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Nat Rev Drug Discov. 2007 Jun;6(6):443-53. doi: 10.1038/nrd2310. PMID: 17541417; PMCID: PMC7098199. **RNA**, ácido ribonucleico; **siRNA**, RNA de interferencia pequeño; **hTTR**, amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina.

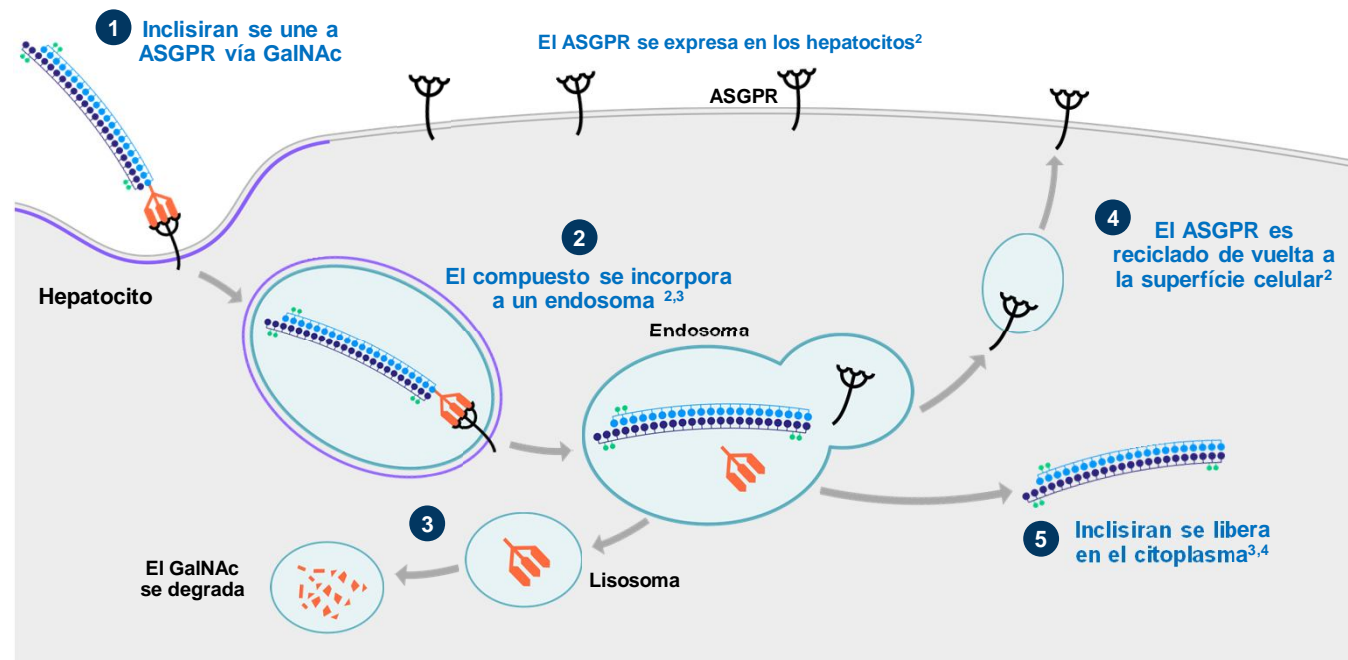
# Desarrollo de GalNAc triramificado. Receptores ASGRP en hepatocitos

## Chemical Configuration



Khvorova A. Oligonucleotide therapeutics - A new class of cholesterol-lowering drugs. *N Engl J Med.* 2017;376(1):4-7.  
**GalNAc**, N-Acetilgalactosamina

# La conjugación con GalNAc dirige a hepatocitos

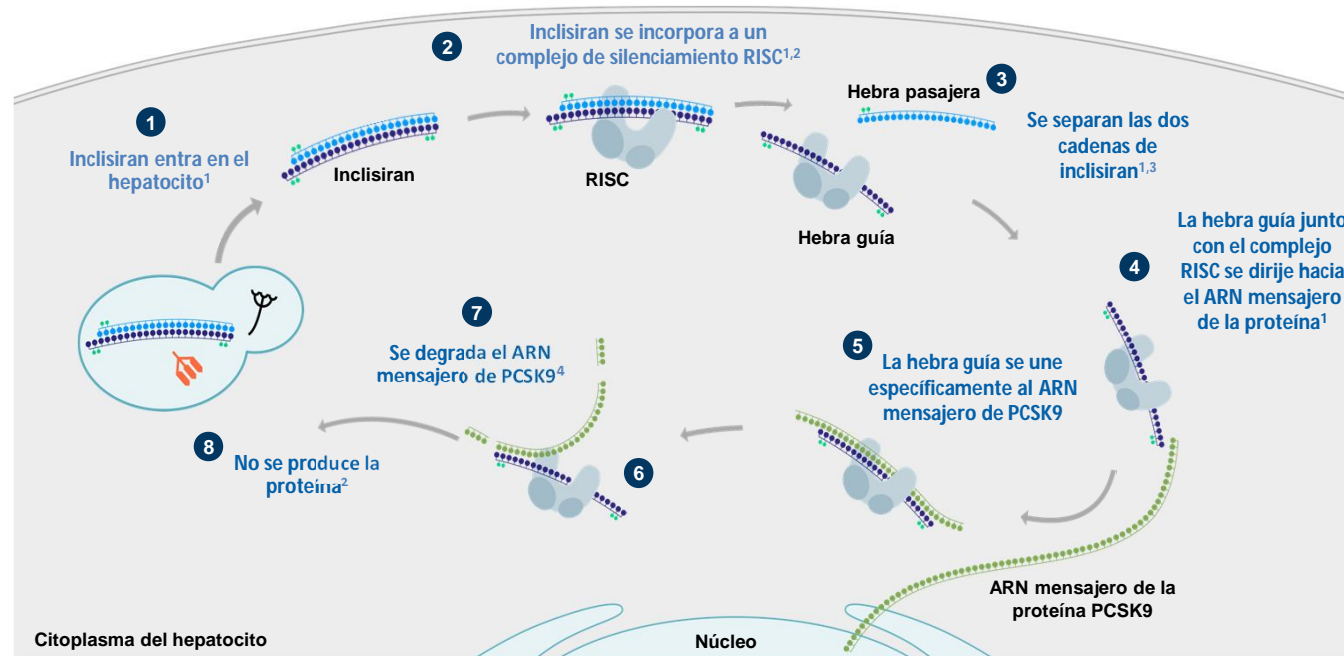


1. Wang N, et al. Circ Res. 2017;120:1063-1065; 2. Springer AD, et al. Nucleic Acid Ther. 2018;28:109-118

3. Khorova A, et al. N Engl J Med. 2017;376:4-7; 4. Tsouka AN, et al. Curr Pharm Des. 2018;24:3622-3633

. **ASGPR**, receptor de la asialoglicoproteína; **ARNip**, ARN de interferencia pequeño; **GalNAc**, N-Acetilgalactosamina.

## ¿Por qué es tan duradero el efecto del siRNA?



1. Tsouka AN, et al. Curr Pharm Des. 2018;24:3622-3633; 2. Khvorova A, et al. N Engl J Med. 2017;376:4-7

3. Rand TA, et al. Cell. 2005;123:621-629; 4. Lam JKW, et al. Mol Ther Nucleic Acids. 2015;4:e252.

**ARN**, ácido ribonucleico; **ARNip**, ARN de interferencia pequeño; **PCSK9**, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9;

**RISC**, complejo de silenciamiento inducido por ARN.

## Oligonucleótidos para uso humano

| Drug                     | Type        | Modif.                 | Conditions                                  | Target                      | Year     | Status            |
|--------------------------|-------------|------------------------|---|-----------------------------|----------|-------------------|
| Vitravene<br>Formivirsen | ASO         | PS                     | Citomegalovirus<br>Retinitis                | IE2                         | 1998     | Discont.          |
| Macugen<br>Pegaptanib    | Aptamer     | PS, 2'-F, 2'-OMe       | Aged-related<br>degeneration macular        | VEGF 165                    | 2004     | Active            |
| Kynamro<br>Mipomersen    | ASO, Gapmer | PS, MOE                | Homozygous familial<br>hypercholesterolemia | Apo B-100                   | 2013     | Active            |
| Exondys 51<br>Eteplirsen | ASO         | PMO                    | Duchene muscular dystrophy                  | Exon 51<br>dystrophine      | 2016     | Active            |
| Spinraza<br>Nusinersen   | ASO         | PS, MOE                | Spinal muscular dystrophy                   | SMN2                        | 2016     | Active            |
| Tegsedi<br>Inotersen     | ASO         | PS, MOE, gapmer        | hATTR                                       | Transthyretin               | 2018     | Active            |
| Onpattro<br>Patisiran    | siRNA       | 2'-OMe                 | Familial amyloid<br>polyneuropathy          | Transthyretin               | 2018     | Active            |
| Givosiran<br>Givlaari    | siRNA       | GalNAc, 2'-OMe<br>2'-F | Acute hepatic porphyria                     | Aminolevulinate<br>synthase | 2018     | Active            |
| Waylivra<br>Volanesorsen | ASO         | MOE                    | Familial chylomicronemia<br>syndrome        | apolipoprotein C-III        | 2019     | Active            |
| Vyondys 53<br>Golodirsen | ASO         | PMO                    | Duchene muscular dystrophy                  | Exon 53<br>dystrophin       | 2019     | Active            |
| Viltepso /Viltolarsen    | ASO         | PMO                    | Duchene muscular dystrophy                  | Exon 53<br>dystrophin       | 2020     | Active            |
| Inclisiran /Leqvio       | siRNA       | GalNAc 2'-OMe<br>2'-F  | Hypercholesteremia                          | PCSK9                       | On going | Phase 3<br>CHMP + |
| Miravirsen               | antimiRNA   | LNA, PS                | Hepatitis C virus                           | miRNA-122                   | On going | Phase 2           |

Jorge AF, Grijalvo S, Aviñó A, Fàbrega C, Eritja R. Advances in therapeutic oligonucleotides chemistry. Chapter 7 in *Nucleic Acids Chemistry* (Eritja R. Ed.) (2021) en prensa. **ASO**: antisense oligonucleotide; **PS**: phosphorothioate; **2'-OMe**: 2'-O-methyl-RNA; **2'-F**: 2'-F-RNA; **LNA**: locked nucleic acids, **MOE**: methoxyethyl; **GalNAc**: *N*-acetylgalactosamine; **PMO**: phosphorodiamidate morpholino; **hATTR**: human transthyretin amyloidosis, **PCSK9**: proprotein convertase subtilisin kexin type 9